

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
Prof. Dr. VASILESCU CĂTĂLIN**

**Student-doctorand:
DRAGOMIR MIHNEA-PAUL**

2020

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ

*Rolul ARN-urilor non-codante în complicațiile
post-splenectomie*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
Prof. Dr. VASILESCU CĂTĂLIN**

**Student-doctorand:
DRAGOMIR MIHNEA-PAUL**

2020

Cuprinsul tezei de doctorat

Introducere	11
Partea generală	18
1. Pacientul asplenic.....	19
1.1 Despre splină	19
1.2 Despre splenectomie	28
1.3 Despre complicațiile post-splenectomie	37
2. ARN-urile non-codante	53
2.1 Despre genele non-codante.....	53
2.2 Despre microRNA.....	58
2.3 Despre pyknoni	65
2.4 Despre ARN-uri lungi non-codante (lncRNA)	68
2.5 Despre regiuni transcrise ultra-conservate (T-UCR).....	74
3. ARN-urile non-codante în sepsis și inflamație	78
3.1 Despre ARN-uri non-codante în patologii infecțioase și sepsis	78
3.2 Despre ARN-urile non-codante în alte afecțiuni hematologice	86
Contribuții personale.....	90
4. Ipoteze de lucru și obiectivele generale.....	91
4.1 ARN-ul non-codant în plasma și în celulele imune ale pacienților splenectomizați	91
4.2 Comparație cu imunosupresia din sepsis. Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie.....	93
5. Rolul ARN-urilor non-codant în complicațiile post-splenectomie. Comparație cu imunosupresia din sepsis.....	94
5.1 Introducere.....	94
5.1.1 ARN-ul non-codant în plasma și în celulele imune ale pacienților splenectomizați	94
5.1.2 Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie.....	96
5.2 Materiale și metode.....	103
5.2.1 ARN-ul non-codant în plasma și în celulele imune ale pacienților splenectomizați	103
5.2.2 Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie.....	110
5.3 Rezultate	118
5.3.1 ARN-ul non-codant în plasma și în celulele imune ale pacienților splenectomizați	118
5.3.2 Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie.....	139
5.4 Discuții	162

5.4.1 ARN-ul non-codant în plasma și celulele imune ale pacienților splenectomizați	162
5.4.2 Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie.....	166
6. Concluzii și contribuții personale.....	171
6.1 ARN-ul non-codant în plasma și celulele imune ale pacienților splenectomizați	171
6.2 Comparație cu imunosupresia din sepsis. Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie.....	172
Bibliografie	173
Anexe.....	193

Introducere

Funcțiile splinei sunt încă cercetate și intens dezbătute în comunitățile științifice internaționale. În prima jumătate a secolului al XX-lea, splenectomia se efectua pentru orice afecțiune mai gravă a acestui organ. Opțiunea pentru splenectomie a fost constant diminuată începând cu mijlocul secolului al XX-lea, când s-a observat că ea este urmată de anumite complicații infecțioase grave, printre care sepsisul este cel mai de temut (King and Shumacker, 1952). Sepsisul la pacienții splenectomizați a fost denumit „overwhelming postsplenectomy infection” (OPSI). Din această cauză, indicațiile pentru splenectomie au început să fie mai puține, deși chirurgia splinei a înregistrat mari progrese. Astfel, în a doua jumătate a secolului al XX-lea, s-au efectuat primele splenectomii parțiale de către Campos Christo (Christo, 1962) și splenectomii sub-totale pentru mielofibroză de către Morgenstern și colaboratorii (Morgenstern et al., 1966). În câteva decenii, chirurgia conservativă a splinei a devenit metoda de elecție în tratamentul diferitelor boli ale splinei. Este important de menționat, că pe lângă OPSI, s-au detectat și alte complicații la pacienții asplenici. Cele mai importante complicații non-infecțioase sunt: arteriale (infarct miocardic acut, accident vascular cerebral), venoase (tromboză venoasă), hipertensiunea pulmonară și cancerul (Dragomir et al., 2016). Astfel, în ciuda faptului că splenectomia electivă este considerată o metodă de tratament eficientă a maladiilor hematologice, această metodă terapeutică, este din ce în ce mai puțin indicată de hematologi (Serio et al., 2013).

În paralel, la nivelul cercetării fundamentale, s-a încercat înțelegerea mecanismelor care predispun pacientul asplenic la sepsis fulminant. În acest sens, s-a dorit înțelegerea mecanismelor care predispun la complicații pacienții asplenici sau hiposplenici. S-a ajuns, la descrieri foarte precise ale funcției splinei, atât în imunitatea înăscută cât și în cea dobândită. Imunitatea înăscută la nivelul splinei este reprezentată, în primul rând, de macrofage, iar cea dobândită de limfocitele B, capabile să secrete imunoglobulinele M (IgM). Secreția de IgM scade semnificativ post-splenectomie, acest fenomen explicând parțial complicațiile infecțioase post-splenectomie. De asemenea, splenectomia este urmată de o reorganizare a distribuției de celule imune circulante caracterizată prin creșterea numărului de limfocite T helper tip 2 și CD25+ și scăderea limfocitelor T CD4+. Este însă important de menționat faptul că mecanismele care duc la complicațiile post-splenectomie, în special la sepsis, sunt încă puțin înțelese (Vasilescu, 2016).

O lucrare originală pentru înțelegerea mecanismelor sepsisului (complicația cea mai severă după splenectomie) a fost publicată în 2009 de către Vasilescu și colaboratorii (Vasilescu

et al., 2009) care arată că, la pacientul septic, expresia miRNA din plasmă și din celulele imune este modificată. Autorii arată că expresia miR-150 este scăzută la pacienții septici, iar scăderea se corelează cu Sequential Organ Failure Score (SOFA). Această publicație a fost urmată de numeroase alte articole care atestă rolul miRNA în sepsis. Multe dintre aceste articole au fost sintetizate în două studii sistematice din 2016: aparținând lui Benz și colaboratorii (Benz et al., 2016) și lui Ho și colaboratorii (Ho et al., 2016). Înțelegerea sepsisului folosind miRNA a rămas o importantă preocupare a colectivului nostru de cercetare de la departamentul de chirurgie Fundeni. În 2014, Tudor și Gîză, au fost primii care au documentat o creștere (o reactivare) a expresiei miRNA exogene (de origine virală) în plasma pacienților septici atât de la MDACC, cât și a celor de la Institutul Clinic Fundeni (FCH). Cele două miRNA virale dereglate în plasmă aparțin genomului virusului herpetic asociat sarcomului Kaposi (KSHV), acestea sunt KSHV-miR-K12-12* și KSHV-miR-K12-10b, iar funcțional autorii au arătat ca aceste miRNA sunt agoniști direcți ai receptorilor de tip Toll-Like 8 (TLR8) (Tudor et al., 2014). În paralel, pe plan internațional au apărut primele publicații care au dovedit și implicarea altor specii de ncRNA, în special long non-coding RNA (lncRNA), în fiziopatologia sepsisului. În momentul de față, se dezvoltă primele terapii care folosesc miRNA în sepsis. În acest scop, se utilizează modele murine de sepsis (precum cecal ligation and puncture – CLP), în care, după inducerea sepsisului, se administrează intra-peritoneal diferite tipuri de molecule miRNA (sau anti-miRNA) și se analizează efectul acestora asupra supraviețuirii șoarecilor.

O primă ipoteză de lucru este că splenectomia induce o schimbare a expresiei miRNA atât în plasmă, cât și în celulele imune circulante. Mai mult, având în vedere rolurile altor ncRNA în imunitate, se poate presupune că și alte specii de ncRNA ar putea fi modificate la nivel celular post-splenectomie. O a doua ipoteză de lucru este că imunosupresia post-splenectomie este similară cu cea din sepsis și acest fenomen se poate observa la nivelul rețelelor de miRNA. Având în vedere cercetările legate de ncRNA din oncologie (Volinia et al., 2010, Dragomir et al., 2018), s-a considerat că expresia unei miRNA nu se modifică izolat, ci în asociere cu alte miRNA. Astfel, formează rețele distincte care se modifică în diferite stări patologice (pre- și post-splenectomie, sănătoși versus septici, pre- și post-chirurgical).

Ipoteze de lucru, obiectivele generale și metodologia de cercetare

ARN-ul non-codant în plasma și în celulele imune ale pacienților splenectomizați

1. Prima ipoteză este că splenectomia induce modificări ale expresiei miRNA circulante în plasmă. Expresia miRNA se va modifica dinamic. Este de așteptat ca, imediat după splenectomie, anumite miRNA să fie modificate, iar, tardiv, după splenectomie, alt grup de miRNA să prezinte o expresie modificată, similar cu dinamica riscului de complicații post-splenectomie (fiind mai mare imediat după operație). De asemenea, având în vedere că s-a observat creșterea a două miRNA virale în sepsis, este de așteptat și ca aceste xeno-miRNA să fie crescute.

Pentru a verifica aceste ipoteze, se vor colecta probe repetate de plasmă de la pacienții splenectomizați și se va măsura expresia miRNA folosind metoda qRT-PCR. Se va măsura expresia a 12 miRNA raportate anterior a avea un nivel de expresie modificat în sepsis (inclusiv cele 2 miRNA virale, descoperite modificate în sepsis: KSHV-miR-K12-10b și KSHV-miR-K12-12*).

2. Expresia miRNA post-operator va fi diferită între pacienți la care s-a efectuat splenectomia prin abord deschis față de pacienți operați prin abord minim invaziv.

Se va testa această ipoteză comparând expresia miRNA circulante, diferit exprimate între cele două subgrupe, în ziua 7 post-operator.

3. Expresia miRNA circulante se corelează cu numărul celulelor imune circulante sau cu nivelul de hemoglobină. O corelație semnificativă va sugera astfel, că miRNA circulante ar putea să provină din celulele imune, eritrocite sau trombocite.

Pentru a verifica această ipoteză se va corela expresia miRNA diferit exprimate cu nivelul diferitelor celule sanguine circulante.

4. Splenectomia va induce modificări ale expresiei de ncRNA și la nivelul celulelor imune circulante. Modificările pot afecta și alte clase de ncRNA decât miRNA, de exemplu, T-PYK, lncRNA sau T-UCR. MiRNA cu expresia modificată din leucocitele circulante pot fi aceleași cu miRNA modificate din plasmă; astfel poate fi determinată originea miRNA plasmatică.

Pentru a testa ipoteza, se vor recolta leucocite circulante de la pacienți splenectomizați (pre-operator, la 7 și 30 de zile post-operator). Se va extrage ARN-ul total și se va hibridiza cu probele de pe platforma de *microarray* specifică pentru ncRNA. Se va compara expresia de

ncRNA între grupul pre- și post-operator și se vor descoperi ncRNA diferit exprimate. O parte dintre aceste ncRNA vor fi confirmate printr-o a doua metodă – qRT-PCR.

5. *MiRNA cu expresia modificată de la nivelul leucocitelor circulante controlează multiple mRNA care fac parte din căi de semnalizare intra- și extracelulare* cu posibilitatea de a explica riscul crescut al pacienților splenectomizați la sepsis, dar și la alte complicații neinfecțioase post-splenectomie.

Pentru a verifica această ipoteză, se vor folosi metode computaționale care indică țintele miRNA de tip mRNA. Țintele de tip mRNA vor fi integrate în programe de analiză a căilor de semnalizare intra- și extracelulare.

6. *Există un mecanism comun care controlează expresia modificată a diferitelor clase de ncRNA intracelulare.* Se pot lansa mai multe ipoteze care pot explica mecanismul care controlează expresia modificată a diferitelor clase de ncRNA: (i) diferitele ncRNA dereglate pot avea localizări genomice comune și un mecanism local care activează sau inhibă expresia acestora; (ii) perechi de ncRNA cu o expresie care se corelează direct și nu sunt colocalizate la nivelul genomului, pot fi activate sau inhibate de factori de transcripție comuni; și (iii) perechi de ncRNA care sunt invers corelate pot interacționa direct, fiind complementare la nivelul secvenței de baze azotate.

Pentru a testa aceste ipoteze se vor folosi baze de date și metode de predicție computaționale. Pentru a verifica localizarea genetică a diferitelor ncRNA, se va utiliza genome browser-ul de la UCSC; pentru a verifica factorii de transcripție se va utiliza o metodă automată de extragere a acestor date dintr-un browser, precum cel de la UCSC. Vor fi luați în considerare factorii de transcripție confirmați experimental și localizați la 5 kb în amonte de gena studiată și, pentru a testa complementaritatea între transcripți, se vor folosi metode bioinformatică care aliniaza secvențele acestora.

7. *De asemenea, am presupus că majoritatea genelor non-codante diferit exprimate post-splenectomie, atât cele circulante, cât și cele celulare, sunt exprimate și în celulele imune ale indivizilor sănătoși.* Dacă expresia va fi diferită între diversele tipuri de celule imune, în funcție de cele în care transcriptul este exprimat, se poate înțelege dacă acest ncRNA joacă un rol în imunitatea înnăscută sau dobândită.

Se va verifica ipoteza prin utilizarea bazei de date DICE, care conține rezultate de deep-sequencing de la 91 de indivizi sănătoși; se vor analiza 15 tipuri diferite de celulele imune. Expresia de ncRNA se va compara între subtipurile de celule imune disponibile.

Comparație cu imunosupresia din sepsis. Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie

1. Rețeaua miRNA circulante ale pacienților septici este diferită de cea a indivizilor sănătoși, iar acest lucru permite diferențierea grupului septic de grupul control.

Se vor folosi date de qRT-PCR pentru a construi rețele miRNA la grupul control și la grupul pacienților septici. Rețelele se vor realiza utilizându-se trei metode statistice diferite: metoda corelației liniare, metoda de analiză tip cluster și metoda de inferență bayesiană. Se vor compara rețelele între ele pentru a observa dacă există modificări importante în ceea ce privește nodurile și muchiile.

2. Rețeaua miRNA circulante ale pacienților pre-operatori și post-operatori (SIRS) este diferită de cea a pacienților septici versus control, iar acest lucru permite diferențierea grupului septic de cei cu SIRS.

Ipoteza va fi verificată prin utilizarea unor metode similare cu cele descrise anterior, dar se va folosi expresia miRNA de la pacienții pre și post-operator.

3. Modificările structurale observate la nivelul rețelelor pot fi explicate utilizând date biologice existente. Pentru a înțelege o rețea formată din date de expresie, ca prim pas trebuie definită semnificația unei muchii. O interpretare posibilă ar fi că o muchie între două miRNA reprezintă o țintă comună de tip mRNA sau un alt ncRNA care interacționează cu ambele molecule miRNA (ceRNA).

Se vor utiliza metode de modelare matematică și se vor căuta ținte comune pentru a testa ipoteza conform căreia o muchie în rețeaua de expresie este un mRNA sau un lncRNA.

4. Rețelele de miRNA ale pacienților splenectomizați sunt similare cu cele din sepsis. Plecând de la aceeași premiză, că miRNA ar avea un rol în riscul crescut de sepsis al pacienților splenectomizați, se poate lansa această ipoteză.

Folosind expresia miRNA obținută prin metoda qRT-PCR, se vor construi rețele prin metoda corelației liniare pentru pacienții pre- și post-splenectomie. Acestea se vor compara între ele din punct de vedere structural, dar și cu rețelele miRNA de la pacienții septici și grupul control.

Rezultate

ARN-ul non-codant în plasma și în celulele imune ale pacienților splenectomizați

S-a observat că după splenectomie, expresia a șase miRNA în plasmă crește (similar sepsisului). Aceste șase miRNA sunt: miR-223, miR-16, miR-93, miR-26a, miR-26b și miR-146a. În acest fel, se observă asemănarea dintre plasma pacientului splenectomizat și cea a pacientului septic. Așadar, pacientul splenectomizat poate fi considerat „pacient pre-septic” din punctul de vedere al expresiei miRNA (Dragomir et al., 2019). Expresia miRNA virale nu s-a modificat (miR-K12-10b) sau nu a fost detectabilă (miR-K12-10b) după splenectomie

S-a observat că expresia miR-223, miR-16 și miR-26b (cele mai diferit exprimate miRNA) se corelează semnificativ cu expresia trombocitelor (Spearman $r = 0,3171$, $r = 0,3175$ și respectiv $r = 0,2172$). De asemenea, s-a observat că expresia acestor trei miRNA se corelează cu numărul limfocitelor pe μl (Spearman $r = 0,2467$, $r = 0,2948$ și respectiv $r = 0,2657$). S-a analizat și dacă celelalte trei miRNA (miR-93, miR-26a și miR-146a) care își modifică expresia post-splenectomie se corelează cu expresia trombocitelor și limfocitelor. S-a observat că expresia miR-26a și miR-146a este corelată semnificativ statistic cu numărul trombocitelor (Spearman $r = 0,2216$ și respectiv $r = 0,3369$), dar nu și expresia miR-93. De asemenea, se poate constata că expresia miR-93, miR-26a și miR-146a se corelează cu numărul trombocitelor (Spearman $r = 0,2512$, $r = 0,2750$ și respectiv $r = 0,2355$).

S-a comparat expresia celor 11 miRNA exprimate în ziua 7 post-splenectomie (D7) la pacienții operați prin abord deschis ($n=10$) cu cei operați prin abord minim invaziv ($n=14$). Nicio miRNA nu a prezentat o diferență în expresie între cele două grupe de pacienți. Astfel, se poate concluziona că diferența de expresie a miRNA nu este cauzată de inflamația chirurgicală *per se* ci de splenectomie.

Mult mai spectaculoase au fost observațiile făcute la nivelul celulelor imune, unde s-a utilizat *array*-ul pentru ncRNA și s-a detectat că splenectomia induce o reorganizare a întregului ncRNA intracelular. Pe scurt, aceste modificări pot fi caracterizate de o creștere globală a miRNA (expresia a 17 miRNA crește și doar trei miRNA scade) și o scădere a T-PYK (expresia a 24 de T-PYK scade și a 15 T-PYK crește). De asemenea, s-a observat că, cu cât este mai lungă o genă de ncRNA (> 200 nucleotide - nt, precum lncRNA), cu atât expresia se modifică mai puțin (este mai puțin dinamică). Expresia de lncRNA și T-UCR se modifică foarte puțin după splenectomie. Datele de expresie ncRNA intracelulară nu pot fi comparate cu cele din sepsis, în absența unui studiu amplu pe diferite specii de ncRNA. Merită însă menționat studiul

lui Xiao și colaboratorii care au observat în 2011 o dereglare la fel de amplă la nivelul mRNA intracelular la pacienții în stare de șoc (de diferite etiologii) (Xiao et al., 2011). Xiao a numit această dereglare „*genomic storm*”.

S-a folosit qRT-PCR pentru a confirma datele de *array*. S-au ales două miRNA în acest scop, care sunt crescute semnificativ post-splenectomie și se știe că au un rol important în sepsis și în imunitate: miR-324 și miR-335. Datele de qRT-PCR au confirmat că miR-324 este crescută post-splenectomie ($P = 0,0455$); și miR-335 prezintă o tendință clară de a crește post-splenectomie (P nu este semnificativ statistic). Foarte interesant, pacienții cu valori crescute sunt aceiași în analiza de tip *array* și qRT-PCR. MiRNA plasmatice diferit exprimate nu sunt comune cu miRNA celulare diferit exprimate. În concluzie miRNA plasmatice nu provin doar de la nivelul celulelor imune (Dragomir et al., 2019).

Detectând țintele de tip mRNA a miRNA intracelulare crescute și scăzute s-a putut analiza rolul acestor miRNA la nivelul căilor de semnalizare intracelulară. S-a observat că, atât grupul crescut, cât și cel scăzut de miRNA, sunt implicate în căi de semnalizare cu rol în imunitate, neo-angiogenează și cancer, explicând astfel, parțial, anumite complicații post-splenectomie (Dragomir et al., 2019).

Pașii următori au constat în înțelegerea mecanismului care controlează aceste modificări sincronizate la nivelul ncRNA. S-a observat că cele mai dereglate ncRNA, miRNA și T-PYK se corelează între ele, atât direct, cât și indirect. S-a verificat dacă aceste perechi sunt localizate în aceleași regiuni genomice. Surprinzător, doar un foarte mic număr de perechi aveau localizare comună. S-a putut însă înțelege dereglarea perechilor de miRNA-T-PYK prin detectarea factorilor de transcripție comuni pentru corelațiile directe și a interacțiunii dintre transcripți bazată pe complementaritate în cazul perechilor invers corelate.

În cele din urmă s-a observat că ncRNA detectate sunt exprimate specific în 15 tipuri de celulele imune studiate, folosind date de la 91 de donatori sănătoși (Dragomir et al., 2019).

Comparație cu imunosupresia din sepsis. Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie

Scopul acestei secțiuni a fost să se compare imunosupresia din sepsis cu imunosupresia post-splenectomie la nivelul rețelelor de miRNA.

În primul rând, am observat că rețelele miRNA ale pacienților septici sunt fragmentate, conțin multe noduri izolate, comparativ cu rețelele miRNA ale pacienților non-septici (grupul control) (Vasilescu et al., 2017). Frecvent cele două miRNA virale nu sunt conectate la rețeaua

principală, fiind noduri izolate. Aceste date au fost confirmate folosind trei metode diferite de a construi rețele, ceea ce dovedește că există o diferență reală între rețeaua de miRNA în sepsis și rețeaua de miRNA a grupului control.

În al doilea rând, s-a remarcat un fenomen invers în cazul rețelelor pre- și post-chirurgicale. S-a observat că rețeaua pre-chirurgicală are foarte puține muchii, fiind compusă din subrețele, formate din puține noduri, fără să existe o rețea principală. Numeroase miRNA sunt noduri izolate. Post-chirurgical, s-a observat o rețea principală, iar doar puține sunt izolate. Numărul de muchii crește în rețeaua post-chirurgicală. S-au comparat modificările observate între rețelele control și sepsis cu rețelele pre- și post-chirurgicale. Așa cum era de așteptat, având în vedere că modificările sunt opuse, testul chi-pătrat a confirmat o diferență semnificativ statistică între cele două perechi de rețele din punct de vedere al modificărilor care apar la nivelul muchiilor. S-a concluzionat că sepsisul și nu oricare stres inflamator, induce o fragmentare și o sărăcire a numărului de muchii în rețeaua miRNA din plasmă (Vasilescu et al., 2017).

Analizând mai atent rețelele construite prin metoda coeficientului de corelație, s-a observat că în sepsis, apar doar două muchii noi, între miR-16 și miR-486 și miR-342 și miR-93. S-a considerat că nodurile izolate, precum cele două miRNA virale și nodurile cu puține muchii atât în sepsis cât și la grupul control (ca miR-342, miR-486 și miR-150), joacă un rol puțin important. S-a observat că un grup de noduri rămâne foarte bine conectat în sepsis, miRNA acestui grup sunt: miR-23, miR-26a, miR-26b, miR-93, miR-223 și miR-21. Toate aceste miRNA sunt conectate fiecare cu fiecare atât în rețeaua control, cât și în rețeaua sepsis. S-a denumit acest grup, grupul C. Similar, s-a observat un grup de 5 miRNA care, în rețeaua control, avea toate nodurile conectate între ele și foarte bine conectate cu grupul C. În schimb, în sepsis, toate aceste noduri își pierd toate legăturile și devin noduri izolate. Acest grup a fost denumit S („*sponged*”). Din acest grup de noduri fac parte: miR-182, miR-146a, miR-155, miR-16 și miR-29a (Vasilescu et al., 2017).

Astfel, s-a analizat ce se întâmplă cu grupul S. Plecând de la premisa că rata de reacție a unui miRNA față de ținta sa nu se modifică, este probabil că singura explicație pentru pierderea tuturor muchiilor din grupul S și muchiilor dintre grupului S și grupul C, este apariția unei noi ținte. Această țintă este comună pentru toate nodurile grupului S. În acest scop, s-au căutat toate țintele comune ale grupului S. Pentru a confirma că aceste ținte sunt comune doar grupului S, s-au căutat și toate țintele comune grupului C. S-au folosit mai multe baze de date și s-au găsit opt ținte comune pentru grupul S: ATP13A3, CDKN1A, GSK3B, RAPH1, TET3, TP53INP1 și TSPAN14 și trei ținte comune pentru grupul C: AGO2, MDM2 și SP1. Niciuna dintre țintele

comune grupului S nu este comună și grupului C. Se presupune astfel, că în sepsis, una dintre aceste ținte are expresia crescută și blochează cele 5 miRNA ale grupului S (Vasilescu et al., 2017).

În ultimul rând, s-au construit rețele miRNA la pacienți înainte și după splenectomie. S-a observat că rețeaua de miRNA pre-splenectomie este mai bine conectată decât rețeaua post-splenectomie. Rețeaua pre-splenectomie este formată dintr-un graf unic, fără a avea noduri izolate. Cel mai conectat nod în această rețea este miR-23, cu 7 muchii. Rețeaua miRNA post-splenectomie este formată dintr-un graf principal și două noduri izolate. Deloc surprinzător, nodurile izolate sunt miR-486 și miR-K12-10b. Un singur nod este foarte bine conectat, miR-223, cu 6 muchii. MiR-223 este singurul miRNA care este crescut imediat, dar și tardiv post-splenectomie. Din punct de vedere al semnificației biologice, s-a observat că două miRNA, care fac parte din aceeași familie, miR-26 (miR-26a și miR-26b), și ale căror forme mature au aceeași secvență (diferența fiind de două baze azotate), sunt conectate atât în rețeaua pre-splenectomie, cât și post-splenectomie. Aceste două miRNA sunt conectate în aproape orice rețea analizată, confirmând faptul că rețelele reprezintă un fenomen biologic real.

Se poate concluziona, că splenectomia induce o reorganizare a rețelei de miRNA și o sărăcire a acesteia, similară cu sepsisul, dar fenomenul este de o amplitudine mai redusă. Acest lucru confirmă observațiile făcute la nivelul expresiei miRNA post-splenectomie.

Concluzii și contribuții personale

ARN-ul non-codant în plasma și celulele imune ale pacienților splenectomizați

1. *Expresia a șase miRNA circulante (miR-223, miR-16, miR-93, miR-26a, miR-26b și miR-146a) este modificată post-splenectomie. Expresia xeno-miRNA implicate în sepsis, nu se modifică post-splenectomie, miR-K12-10b fiind nemodificat între diferitele grupuri, iar miR-K12-12* nu a fost exprimat.*

2. *Nu s-a observat nicio diferență semnificativă a expresiei miRNA din ziua 7 post-operator între pacienții la care s-a efectuat splenectomia prin abord deschis și pacienții la care s-a efectuat splenectomia prin abord minim invaziv.*

3. *Toate cele șase miRNA diferit exprimate se corelează pozitiv și semnificativ statistic cu expresia limfocitelor și cinci dintre ele (miR-223, miR-16, miR-26a, miR-26b și miR-146a) cu expresia trombocitelor.*

4. *S-a observat o reorganizare a ncRNA la nivelul celulelor imune caracterizată de creșterea numărului de miRNA și scăderea numărului de T-PYK. De asemenea, s-a observat că are loc creșterea a 6 lncRNA, iar expresia T-UCR rămâne nemodificată. Niciuna dintre miRNA circulante diferit exprimate nu a fost detectată modificată în leucocitele totale.*

5. *S-a observat că cele mai afectate căi de semnalizare controlate de miRNA celulare sunt cele implicate în cancer, imunitate și angiogeneză.*

6. *A atras atenția că după splenectomie are loc o dereglare sincronizată a transcripților non-codanți în special miRNA și T-PYK, care se corelează între ei. Dintre cele 123 de perechi de miRNA și T-PYK care se corelează direct, 62 au factori de transcripție comuni. Dintre cele 153 de perechi de miRNA și T-PYK care se corelează invers, 19 prezintă complementaritate între secvențele transcripților.*

7. *S-a remarcat că majoritatea transcripților modificați post-splenectomie sunt exprimați în celulele imune circulante ale voluntarilor sănătoși și expresia este specifică pentru fiecare transcript.*

Comparație cu imunosupresia din sepsis. Rețele de microRNA în sepsis și post-splenectomie

1. Sepsisul induce o reorganizare a rețelei de miRNA, caracterizată în special de pierderea muchiilor. S-a observat că rețeaua miRNA control este o rețea complexă, foarte bine conectată, cu puține sau fără noduri izolate, iar în sepsis această rețea sărăcește, multe dintre muchii dispar și nodurile devin izolate.

2. S-a descoperit că operația induce modificări opuse sepsisului la nivelul rețelelor miRNA. Post-operator, rețeaua devine mai conectată, apar noi muchii și gradul de conectivitate al nodurilor crește. Astfel, pierderea de muchii este specifică sepsisului.

3. S-a considerat că apariția unui nou mRNA ar fi cauza cea mai probabilă de pierdere a unei muchii în rețeaua sepsis. S-a observat că un grup de 5 miRNA își pierd toate conexiunile în sepsis. Analiza computațională a dovedit că cele 5 miRNA au 8 ținte comune.

4. Post-splenectomie, numărul muchiilor scade și rețeaua miRNA devine mai puțin conectată, similar sepsisului

Bibliografie

- BENZ, F., ROY, S., TRAUTWEIN, C., RODERBURG, C. & LUEDDE, T. 2016. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci*, 17.
- CHRISTO, M. C. 1962. Segmental resections of the spleen. Report on the first eight cases operated on. *Hospital (Rio J)*, 62, 575-90.
- DRAGOMIR, M., MAFRA, A. C. P., DIAS, S. M. G., VASILESCU, C. & CALIN, G. A. 2018. Using microRNA Networks to Understand Cancer. *Int J Mol Sci*, 19.
- DRAGOMIR, M., PETRESCU, D. G. E., MANGA, G. E., CALIN, G. A. & VASILESCU, C. 2016. Patients After Splenectomy: Old Risks and New Perspectives. *Chirurgia (Bucur)*, 111, 393-399.
- DRAGOMIR, M. P., TUDOR, S., OKUBO, K., SHIMIZU, M., CHEN, M., GIZA, D. E., et al. 2019. The non-coding RNome after splenectomy. *J Cell Mol Med*.
- HO, J., CHAN, H., WONG, S. H., WANG, M. H., YU, J., XIAO, Z., et al. 2016. The involvement of regulatory non-coding RNAs in sepsis: a systematic review. *Crit Care*, 20, 383.
- KING, H. & SHUMACKER, H. B., JR. 1952. Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg*, 136, 239-42.
- MORGENSTERN, L., KAHN, F. H. & WEINSTEIN, I. M. 1966. Subtotal splenectomy in myelofibrosis. *Surgery*, 60, 336-9.
- SERIO, B., PEZZULLO, L., GIUDICE, V., FONTANA, R., ANNUNZIATA, S., FERRARA, I., et al. 2013. OPSI threat in hematological patients. *Transl Med UniSa*, 6, 2-10.
- TUDOR, S., GIZA, D. E., LIN, H. Y., FABRIS, L., YOSHIKI, K., D'ABUNDO, L., et al. 2014. Cellular and Kaposi's sarcoma-associated herpes virus microRNAs in sepsis and surgical trauma. *Cell Death Dis*, 5, e1559.
- VASILESCU, C. 2016. *Splina. De la laparoscopie la chirurgia robotică și înapoi.* , București, Editura Medicală.
- VASILESCU, C., DRAGOMIR, M., TANASE, M., GIZA, D., PURNICHESCU-PURTAN, R., CHEN, M., et al. 2017. Circulating miRNAs in sepsis-A network under attack: An in-silico prediction of the potential existence of miRNA sponges in sepsis. *PLoS One*, 12, e0183334.
- VASILESCU, C., ROSSI, S., SHIMIZU, M., TUDOR, S., VERONESE, A., FERRACIN, M., et al. 2009. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One*, 4, e7405.
- VOLINIA, S., GALASSO, M., COSTINEAN, S., TAGLIAVINI, L., GAMBERONI, G., DRUSCO, A., et al. 2010. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res*, 20, 589-99.
- XIAO, W., MINDRINOS, M. N., SEOK, J., CUSCHIERI, J., CUENCA, A. G., GAO, H., et al. 2011. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*, 208, 2581-90.

Lista cu lucrările științifice publicate pe perioada doctoratului

Capitol de carte:

1. Titlul cărții: Molecular Biology of Long Non-coding RNAs; Editor: Springer, Cham; Pagini 85-113; Anul: 2019; Titlul capitolului: New Insights into the Molecular Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer Biology; Autori: Ligia I Torsin, **Mihnea P Dragomir**, George A Calin (**co-prim autor**).
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-17086-8_4.

Articole publicate în reviste de specialitate:

1. Patients After Splenectomy: Old Risks and New Perspectives. **M Dragomir**, DGE Petrescu, GE Manga, GA Călin, C Vasilescu. PMID: 27819637 DOI: 10.21614/chirurgia.111.5.393 Chirurgia (Bucharest), Volumul 111, Numărul 5, **BDI, IF 0**, (**prim autor**), <http://revistachirurgia.ro/pdfs/2016-5-393.pdf>.
2. Robotic Surgery: A Solution in Search of a Problem—A Bayesian Analysis of 343 Robotic Procedures Performed by a Single Surgical Team. Simona Manciu, **Mihnea Dragomir**, Fabiana Curea, Catalin Vasilescu. PMID: 28225651 DOI: 10.1089/lap.2016.0323. Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques. Volumul 27, Numărul 4. **ISI, IF 1.257**,
https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/lap.2016.0323?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=lap.
3. Circulating miRNAs in sepsis—A network under attack: An in-silico prediction of the potential existence of miRNA sponges in sepsis. Catalin Vasilescu, **Mihnea Dragomir**, Mihai Tanase, Dana Giza, Raluca Purnichescu-Purtan, Meng Chen, Sai-Ching Jim Yeung, George A Calin. PMID: 28820886 DOI: 10.1371/journal.pone.0183334. PLoS One, Volumul 12, Numărul 8, **ISI, IF 2.776**. (**co-prim autor**).
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183334>
4. Is Radical Antegrade Modular Pancreatosplenectomy the Solution? A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. **Mihnea Dragomir**, Mihai Adrian Eftimie. PMID: 29288607 DOI: 10.21614/chirurgia.112.6.653. Chirurgia (Bucharest), Volumul 112, Numărul 6, **BDI, IF 0**, (**prim autor**), <http://revistachirurgia.ro/pdfs/2017-6-653.pdf>.

5. Circular RNAs in cancer—Lessons learned from microRNAs. **Mihnea Dragomir**, George A Calin. PMID: 29911069 DOI: 10.3389/fonc.2018.00179. *Frontiers in oncology*, Volumul 8. **ISI, IF 4.137, (prim autor)**.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00179/full>.
6. Exosomal lncRNAs as new players in cell-to-cell communication. **Mihnea Dragomir**, Baoqing Chen, George A Calin. PMID: 30148073 DOI: 10.21037/tcr.2017.10.46. *Translational cancer research*. Volumul 7, Numărul Suppl 2. **ISI, IF 1.07, (prim autor)**. <http://tcr.amegroups.com/article/view/16938>.
7. Cancer-associated rs6983267 SNP and its accompanying long noncoding RNA CCAT2 induce myeloid malignancies via unique SNP-specific RNA mutations. Maitri Y Shah, Manuela Ferracin, Valentina Pileczki, Baoqing Chen, Roxana Redis, Linda Fabris, Xinna Zhang, Cristina Ivan, Masayoshi Shimizu, Cristian Rodriguez-Aguayo, **Mihnea Dragomir**, Katrien Van Roosbroeck, Maria Ines Almeida, Maria Ciccone, Daniela Nedelcu, Maria Angelica Cortez, Taghi Manshouri, Steliana Calin, Muharrem Muftuoglu, Pinaki P Banerjee, Mustafa H Badiwi, Jan Parker-Thornburg, Asha Multani, James William Welsh, Marcos Roberto Estecio, Hui Ling, Ciprian Tomuleasa, Delia Dima, Hui Yang, Hector Alvarez, M James You, Milan Radovich, Elizabeth Shpall, Muller Fabbri, Katy Rezvani, Leonard Girnita, Ioana Berindan-Neagoe, Anirban Maitra, Srdan Verstovsek, Riccardo Fodde, Carlos Bueso-Ramos, Mihai Gagea, Guillermo Garcia Manero, George A Calin. PMID: 29567676 DOI: 10.1101/gr.225128.117. *Genome research*, Volumul 28, Numărul 4, **ISI, IF 9.944**.
<https://genome.cshlp.org/content/28/4/432.long>.
8. Key questions about the checkpoint blockade—are microRNAs an answer? **Mihnea Dragomir**, Baoqing Chen, Xiao Fu, George A Calin. PMID: 29951335 DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0006. *Cancer biology & medicine*, Volumul 15, Numărul 2, **ISI, IF 4.467 (prim autor)**.
<http://www.cancerbiomed.org/index.php/cocr/article/view/1138/1255>.
9. Using microRNA networks to understand cancer. **Mihnea Dragomir**, Ana Mafra, Sandra Dias, Catalin Vasilescu, George Calin. PMID: 29949872 DOI: 10.3390/ijms19071871. *International journal of molecular sciences*, Volumul 19, Numărul 7, **ISI, IF 4.183 (co-prim autor)**. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/1871>.
10. Laparoscopic splenectomy for hereditary spherocytosis. A case series and review of the literature. Florin Zaharie, Mihai-Stefan Muresan, Ciprian Tomuleasa, Gheorghe

Popa, Cristina Blag, Roxana Zaharie, Claudiu Zdrehus, **Mihnea Dragomir**, Horia Bumbea, Alexandru Irimie, Delia Dima. PMID: 30221630. Annali italiani di chirurgia. Volumul 7. **ISI, IF 0.793 (colaborator)**.

https://www.annaliitalianidichirurgia.it/wp-content/uploads/2019/01/15_2870_aopblocco.pdf.

11. Should surgical ex vivo lymphadenectomy be a standard procedure in the management of patients with gastric cancer? Mihai Dan Boşcaiu, **Mihnea Dragomir**, Bogdan Trandafir, Vlad Herlea, Cătălin Vasilescu. <https://doi.org/10.1007/s10353-018-0519-z>. European Surgery, Volumul 40, Numărul 4. **ISI, IF 0.483 (co-prim autor)**.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10353-018-0519-z>.
12. SnapShot: unconventional miRNA functions. **Mihnea Paul Dragomir**, Erik Knutsen, George Adrian Calin. PMID: 30096304 DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.040. Cell, Volumul 174, Numărul 4, **ISI, IF 36.216 (co-prim autor)**.
13. CpG island hypermethylation go circular (RNA). **Mihnea P Dragomir**, George A Calin. PMID: 30237846 DOI: 10.18632/oncotarget.26074. Oncotarget, Volumul 9, Numărul 69, **BDI, IF 0 (prim autor)**.
[http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=26074&pubmed-linkout=1](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=26074&pubmed-linkout=1).
14. The involvement of microRNA in the pathogenesis of Richter syndrome. Katrien Van Roosbroeck, Recep Bayraktar, Steliana Calin, Johannes Bloehdorn, **Mihnea Paul Dragomir**, Keishi Okubo, Maria Teresa Sabrina Bertilaccio, Simonetta Zupo, M James You, Gianluca Gaidano, Davide Rossi, Shih-Shih Chen, Nicholas Chiorazzi, Philip A Thompson, Alessandra Ferrajoli, Francesco Bertoni, Stephan Stilgenbauer, Michael J Keating, George A Calin. PMID: 30409799 DOI: 10.3324/haematol.2018.203828. Haematologica, Volumul 104, Numărul 5, **ISI, IF 7.57**. <http://www.haematologica.org/content/104/5/1004.long>.
15. MicroRNA based theranostics for brain cancer: basic principles. George ED Petrescu, Alexandru A Sabo, Ligia I Torsin, George A Calin, **Mihnea P Dragomir**. PMID: 31142339 DOI: 10.1186/s13046-019-1180-5. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, Volumul 38, Numărul 1, **ISI, IF 5.646. (ultim autor și autor corespondent)** <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-019-1180-5>.
16. Old Friend—HCT116. **Mihnea P. Dragomir**. doi:10.1001/jamaoncol.2019.2318. JAMA Oncology. Volumul 5. Numărul 10. Pagini 1513. **ISI, IF 22,416**.
<https://jamanetwork.com/journals/jamaoncolgy/article-abstract/2738776>.

17. The non-coding RNome after splenectomy. **Mihnea P. Dragomir**, Stefan Tudor, Keishi Okubo, Masayoshi Shimizu, Meng Chen, Dana Elena Giza, William Ruixian He, Cristina Ivan, George A. Calin, Catalin Vasilescu. PMID: 31496026 DOI: 10.1111/jcmm.14664 Journal of Cellular and Molecular Medicine. (Epub ahead of print) **ISI. IF 4,658. (prim autor)**
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.14664>.
18. The role of radiotherapy in metaplastic breast cancer: a propensity score-matched analysis of the SEER database. Yongfeng Li, Meng Chen, Barbara Pardini, **Mihnea P Dragomir**, Anthony Lucci, George A Calin. PMID: 31547814 DOI: 10.1186/s12967-019-2069-y Journal of translational medicine Volumul 17, Numărul 1. **ISI. IF 4,098 (autor corespondent)**. <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-019-2069-y>.
19. Central pancreatectomy: a comprehensive, up-to-date meta-analysis. **Mihnea P Dragomir**, Alexandru A Sabo, George ED Petrescu, Yongfeng Li, Traian Dumitrascu. PMID: 31641855 DOI: 10.1007/s00423-019-01829-3. Langenbecks Arch Surg. 2019 Oct 22. [Epub ahead of print], **ISI. IF 2.093 (prim autor)**.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00423-019-01829-3>.
20. The role of exosomal long non-coding RNAs in cancer drug resistance. Mireia Cruz De los Santos, **Mihnea P Dragomir**, George A Calin. Cancer Drug Resist 2019;2:[Online First]. 10.20517/cdr.2019.74. **IF 0 (autor corespondent)**.